

ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

*Miguel Angel Ordorica Vargas**

INTRODUCCION

Han pasado poco más de treinta años desde que en 1953 dos investigadores, hasta entonces prácticamente desconocidos, publicaron un breve artículo⁵⁴ en el que proponían un modelo de la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA) y tiempo después otro en el que discutían el papel del modelo estructural propuesto en la replicación del mismo DNA.⁵⁵ El modelo de la doble hélice se popularizó rápidamente y sus autores, James D. Watson y Francis H. C. Crick, recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1962. ¿Valía tanto esta contribución? Claro que sí, el DNA es el responsable químico de la transmisión de la información genética. En esta molécula se encuentran codificadas las instrucciones que hacen posible la vida de la mayoría de los seres e indudablemente esto justifica la importancia concedida al primer intento exitoso para determinar la estructura secundaria del DNA y explicar la relación entre ella y su función biológica.

Por otro lado, la publicación del modelo de la doble hélice de Watson y Crick, sirvió como el catalizador que desató intensa actividad en las investigaciones sobre la estructura y función de los ácidos nucleicos, DNA y RNA, actividad que aún hoy continúa incrementándose espectacularmente.

Al principio las investigaciones más exitosas fueron las encaminadas a determinar el meca-

nismo de la transmisión y expresión de la información genética en los seres vivos. Este problema aún no está resuelto, pero las investigaciones en el campo han dado frutos tan importantes como las técnicas de recombinación genética⁵ que a mediano plazo podrían cambiar nuestra visión del mundo.³⁶ Con el progreso en este campo se hizo notable la necesidad de conocer a fondo la estructura tridimensional de la molécula del DNA, pues varios detalles de la función biológica no se pueden explicar en forma satisfactoria sólo con las variaciones en la composición química. El estudio detallado de la estructura secundaria del DNA tuvo un avance más lento porque las técnicas de difracción de rayos X, que son la única manera de conocer con precisión la conformación de las moléculas y que con tanto éxito se aplica al estudio de moléculas pequeñas y macromoléculas como las proteínas, tuvieron al principio de los estudios del DNA un alcance limitado, porque el único material con que se contaba eran fibras de DNA natural de composición variable, de las que se obtienen patrones de difracción que no permiten la resolución de la estructura hasta el nivel atómico.¹ Sin embargo, con los datos de difracción de rayos X de los nucleótidos, unidades estructurales del DNA, y comparando los resultados calculados con los datos experimentales,^{1,3} se hicieron mejoras al modelo original de Watson y Crick¹ y se elaboraron otros que demostraban la capacidad del DNA para adoptar conformaciones diferentes.^{1,2,3,39.}

No fue sino hasta años recientes y gracias al avance de métodos de síntesis de oligonucleótidos, cuando ha sido posible contar con fragmentos de DNA de composición conocida en

*Departamento de Bioquímica y Biofísica. Sección de Graduados de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Becario de la COFAA-DEDICT.

cantidades suficientes para formar cristales, y el análisis de éstos ha sido el camino para definir las características de la macromolécula hasta el nivel atómico revelando nuevos detalles estructurales. Los resultados de estos estudios son interesantes, algunos inesperados, y aunque la doble hélice sigue ahí, resultó ser una molécula más complicada de lo que se creía.

FUNDAMENTOS ESTRUCTURALES⁵⁶

Desde un punto de vista estrictamente químico podemos decir que el DNA es un polímero lineal de desoxinucleótidos sin periodicidad en la secuencia. Aunque esta definición en realidad no dice nada de la importancia de la molécula ni su función, sí nos sirve como punto de partida para revisar las bases químicas de la estructura del DNA a partir de sus unidades estructurales fundamentales, los desoxinucleótidos, compuestos complejos que a su vez están formados por tres partes: una base nitrogenada, un desoxiazúcar y ácido fosfórico.

Las bases nitrogenadas del DNA son compuestos heterocíclicos, débilmente básicos y muy poco solubles en agua, las más abundantes son cuatro: dos derivadas de la purina o bases púricas, denominadas adenina (A) y guanina (G), y dos derivadas de la pirimidina o bases pirimídicas, que reciben los nombres de timina (T) y citosina (C); también se pueden encontrar cantidades pequeñas de una serie de bases derivadas de éstas por modificación química como la 5-metilcitosina, que parecen tener importancia en varios aspectos de la estructura y la función del DNA. Es precisamente en la secuencia de bases nitrogenadas del DNA donde se encuentra codificada la información genética (Fig. 1).

El desoxiazúcar del DNA es la desoxirribosa (2-desoxi-D-ribosa) derivado del azúcar de cinco átomos de carbono, ribosa. En el DNA la desoxirribosa (d-ribosa) adquiere la forma cíclica denominada furanósica por su similitud con el heterociclo furano, que consta de un anillo insaturado de cinco lados formado por cuatro átomos de carbono y uno de oxígeno. En

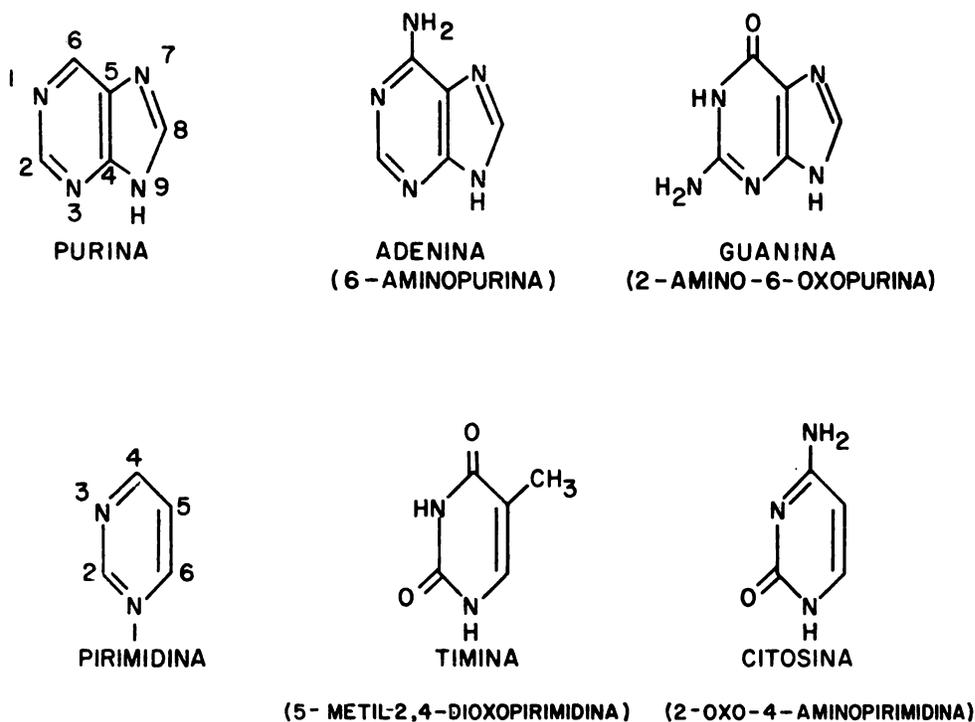


Fig. 1. Bases nitrogenadas más abundantes en el DNA.

la d-ribosa el anillo está formado por los carbonos del uno al cuatro y el oxígeno unido entre estos dos, quedando el carbono cinco fuera del ciclo a un lado del plano imaginario definido por los otros átomos. Debido a los ángulos de enlace entre sus átomos, el anillo de la d-ribosa no es completamente plano y puede adquirir varias conformaciones en las que uno de los átomos sale del plano del ciclo; si dicho átomo queda del mismo lado que el carbono cinco de la molécula se dice que la posición es *endo*, y si se encuentra del lado contrario su posición es *exo*. Dependiendo de las conformaciones del anillo de la d-ribosa, las posiciones relativas de los sustituyentes son diferentes, lo cual influye en la conformación del DNA (Fig. 2).

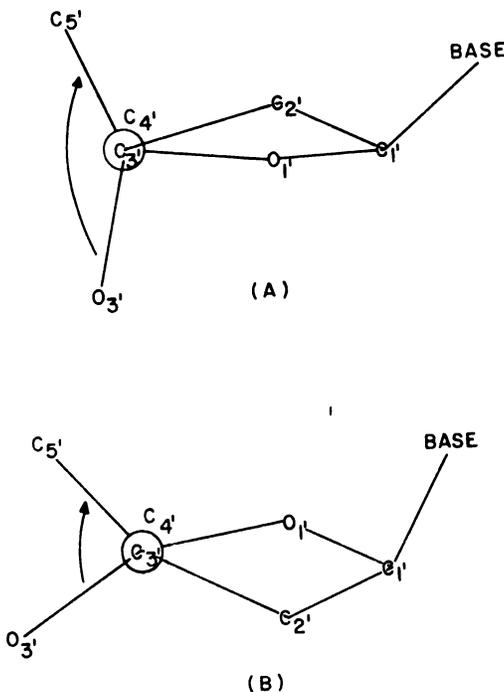


Fig. 2. Conformaciones de la d-ribosa en el DNA. (A) Conformación $C2'endo$ ó $C3'exo$, común en los modelos de DNA con giro a la derecha.³ (B) Conformación $C3'endo$ encontrada en el DNA-Z.⁵² Para dar mayor claridad al esquema se han omitido la mayoría de los sustituyentes. El ángulo de torsión de la d-ribosa está definido por los átomos $C5'$, $C4'$, $C3'$ y $O3'$, tiene valor de cero para la posición eclipsada, es positivo cuando el sustituyente más alejado gira en el sentido de las manecillas del reloj y negativo cuando el giro es en sentido contrario.

Las bases nitrogenadas se unen a la d-ribosa mediante enlaces glicosídicos entre el carbono uno del azúcar y los nitrógenos uno de las pirimidinas y nueve de las purinas; la configuración del enlace es tipo beta, o sea, la base queda del mismo lado que el carbono cinco de la d-ribosa. Aunque la d-ribosa y las bases nitrogenadas son moléculas casi planas, no son coplanares, sino que sus planos son perpendiculares.

Los compuestos formados por la unión de una base y la d-ribosa reciben el nombre de desoxinucleósidos (d-nucleósidos) los cuales son más solubles en agua que las bases libres y se representan con las mismas letras pero añadiendo antes de cada una la letra "d" para indicar que son desoxinucleósidos. Para distinguir entre las posiciones de los átomos de la base y los de la d-ribosa, los átomos de ésta se designan con números seguidos por un apóstrofo, así el carbono 2 del d-nucleósido forma parte de la base, mientras que el carbono 2' está en el anillo de la d-ribosa.

Los d-nucleósidos pueden adquirir dos tipos de conformaciones dependiendo de las posiciones relativas de la d-ribosa y la base, cuando esta última está próxima al anillo de la primera se dice que la conformación es *syn* y cuando queda alejada *anti*. (Ver Fig. 4.) Los d-nucleósidos de las bases púricas pueden adquirir ambos tipos de conformaciones; aunque las *anti* son más estables, las bases pirimídicas tienen un oxígeno unido al carbono dos que disminuye la estabilidad de las conformaciones *syn*, por lo que éstas son poco probables para ellos.^{51,52}

Los desoxinucleótidos (d-nucleótidos) precursores del DNA se forman cuando a un d-nucleósido se le une una molécula de ácido fosfórico mediante un enlace éster con los carbonos 3' o 5' de la d-ribosa; en los d-nucleótidos naturales el fosfato siempre está en la posición 5'. En condiciones intracelulares el ácido fosfórico está totalmente disociado como anión fosfato y es responsable del carácter ácido del DNA.

Las cadenas de d-nucleótidos que forman el DNA están unidas por enlaces éster entre el fosfato del carbono 5' de un d-nucleótido y el carbono 3' del siguiente dando a las cadenas una dirección según la posición de los enlaces éster en los d-nucleótidos de los extremos. Se deno-

mina extremo 3' aquel que no participa en un enlace y 5' al extremo que queda libre de enlace éster; se habla entonces de la dirección 5' a 3' de la cadena o de la inversa.

Las cadenas de ribosa y fosfato que forman el esqueleto continuo de DNA tienen siete ángulos de torsión que se usan para describir su forma tridimensional,⁵² seis de estos ángulos tienen sus ejes en los enlaces que van desde un átomo de fósforo al siguiente en la cadena y el

séptimo en el enlace que une la d-ribosa y la base del d-nucleótido correspondiente (Fig. 3).

LA DOBLE HELICE DE WATSON Y CRICK

Desde que se iniciaron los estudios de la estructura secundaria del DNA se hizo patente que la molécula puede presentar muchas variaciones en su conformación; el modelo de Wat-

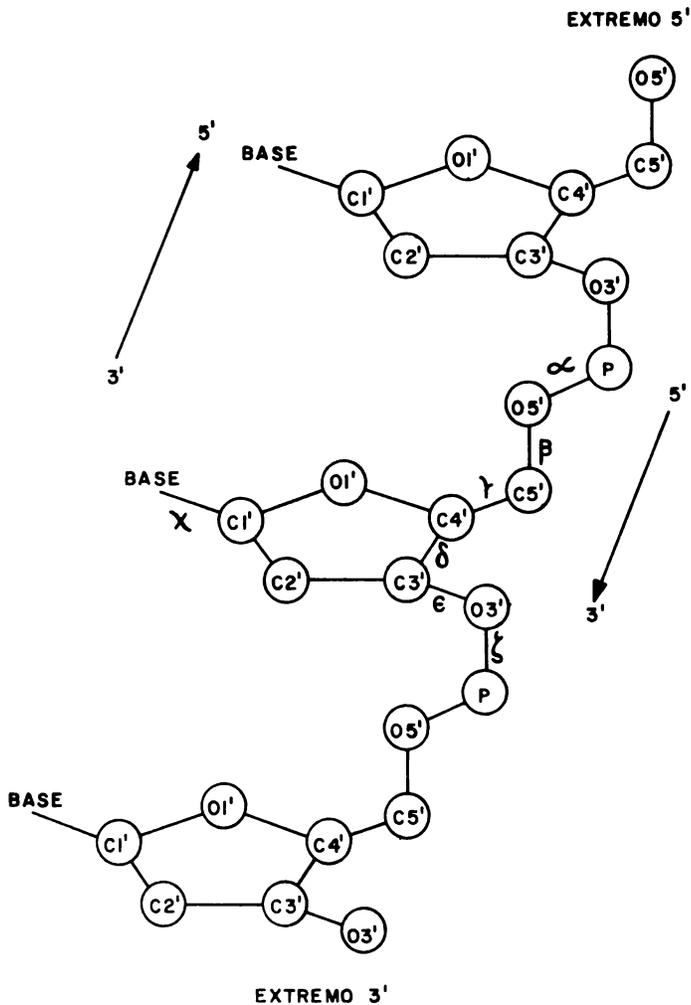


Fig. 3. Definición de los ángulos de torsión de la cadena de d-ribosa y fosfato (de α a ζ) y del nucleótido (χ) del DNA; los valores de los ángulos se asignan siguiendo la convención que se explica en la figura 2. En el esquema también se señala el sentido de las cadenas. Se omiten los sustituyentes para mayor claridad.

son y Crick⁵⁴ es una de las formas posibles y hoy se conoce como forma B del DNA o DNA-B. Este modelo se ha modificado con el tiempo,¹ pero sus rasgos esenciales siguen siendo los mismos.

La estructura secundaria del DNA-B está formada por dos cadenas de d-nucleótidos con secuencia de bases complementaria pero de dirección contraria (antiparalelas) que giran a la derecha alrededor de un eje común completando un giro cada diez pares de bases en una distancia de 3.4 nm, por lo que un par de bases gira 36° respecto al anterior y está separado de éste una distancia de 0.34 nm. La complementariedad de las secuencias de bases está dada por los apareamientos de *A* con *T* y *G* con *C* de diferentes cadenas mediante puentes de hidrógeno. En cambio, la doble hélice se estabiliza por interacciones hidrofóbicas entre los pares de bases adyacentes. Al ser antiparalelas y complementarias, las cadenas de d-nucleótidos no son iguales, pero la secuencia de una determina totalmente la de la otra; esto permite que la información genética se mantenga prácticamente constante de una generación a otra. (Tabla I.)

Las cadenas de d-ribosa y fosfato que forman el esqueleto continuo del DNA están ambas de un solo lado de los pares de bases, y al girar quedan en el exterior de la hélice dejando a las bases en el interior. En la superficie de ésta que-

dan dos hendiduras distintas: una pequeña llamada surco menor del lado en que están ambas cadenas y otra más grande del lado contrario llamada surco mayor (Fig. 4).

El DNA-B se describió primero para fibras de DNA natural con humedad relativa y concentración de sal elevadas. Se considera la forma más importante del DNA desde el punto de vista biológico y se ha demostrado que prácticamente todos los DNA, tanto naturales como sintéticos, pueden adquirirla en condiciones adecuadas.²⁹

A pesar del tiempo transcurrido y los múltiples ensayos realizados, aún existen investigadores que no aceptan la estructura propuesta para el DNA-B y señalan que los datos experimentales también se pueden ajustar a otros modelos. Algunos incluyen doble hélice con giro a la izquierda en lugar de la derecha,²⁰ otros señalan que las cadenas antiparalelas, aunque formarían una doble hélice derecha, podrían tener posiciones diferentes, esto es, la que va de 5' a 3' iría de 3' a 5' y la cadena complementaria tendría la dirección contraria.²⁵ Algunos son más aventurados, pues eliminan la doble hélice y la sustituyen por cadenas antiparalelas que no se entrecruzan, yendo una hacia la derecha y la otra hacia la izquierda, cambiando simultáneamente de dirección cada cinco pares de bases.^{45,48} Aunque este modelo en realidad

TABLA I.

CARACTERISTICAS DE LOS MODELOS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL DNA EN FIBRAS

Parámetro	MODELO			
	A ¹	B ¹	C ²	D ³
Distancia entre pares de bases/nm	0.256	0.338	0.331 + 0.003	0.303
Número de bases por giro	11.0	10.0	8.8 — 9.7	8
Número de nucleótidos en la unidad repetitiva	1	1	1	1
Angulo de rotación por base	32.7°	36°	37.6 — 41°	45°
Angulo de inclinación de las bases normal al eje de giro	+ 19°	-6.0°	-6.0°	-16.4°
Distancia por giro completo/nm	2.86	3.4	2.6 — 3.1	2.45
Conformación del nucleósido	<i>Anti</i>	<i>Anti</i>	<i>Anti</i>	<i>Anti</i>
Conformación de la d-ribosa	<i>C3'-endo</i>	<i>C3'-exo</i>	<i>C3'-exo</i>	<i>C3'-exo</i>

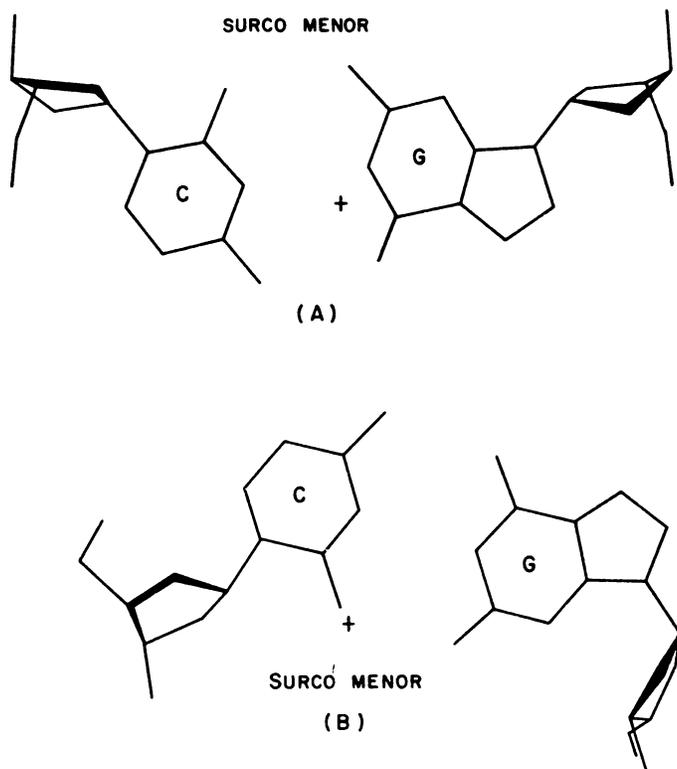


Fig. 4. Apareamiento de guanina y citosina en el DNA-B (A) y DNA-Z (B), en una vista perpendicular al plano de las bases con dirección 3'–5' hacia el interior del dibujo para el nucleótido del lado derecho de ambos esquemas. La cruz señala la posición del eje de giro de la doble hélice. Es de hacer notar la inversión de la posición del surco menor en el DNA-Z respecto al DNA-B, y la diferencia en la conformación del nucleótido de guanina, *anti* en DNA-B y *syn* en DNA-Z, (dibujado a partir de datos de Arnott y Hukins¹ y Wang y cols).⁵²

no es una hélice como la de Watson y Crick, las dos cadenas giran una sobre otra completando un giro cada cien pares de bases aproximadamente. Estas alternativas a la doble hélice se originaron debido a la falta de definición de los datos de difracción de rayos X de fibras de DNA, aunque existen datos que permiten eliminar algunos de ellos.¹⁰ Para terminar la discusión es necesario estudiar sistemas que den resultados sin ambigüedades, como en los cristales de DNA (Fig. 5).

LA ESTRUCTURA CRISTALINA DEL DNA-B

Los primeros análisis de cristales de oligonucleótidos complementarios se publicaron entre 1977 y 1978. En 1980 aparecieron los datos

de la estructura cristalina de un fragmento de lo que parecía ser DNA-B, el cristal del dodecanucleótido dCpdGpdCpdGpdApdApdTpdCpdGpdCpdG (dCGCGAATTCGCG).⁵³ En los cristales de este compuesto se encontró una doble hélice que resultó muy similar a la propuesta por el modelo del DNA-B, con lo que éste recibió apoyo experimental importante. Sin embargo, al definir la estructura hasta el nivel atómico se encontraron algunos detalles que han generado nuevas preguntas respecto de la estructura real del DNA.

Para empezar, en los cristales se encontró que el eje de giro de la doble hélice tiene una curvatura con radio de 11.2 nm.⁵³ Aunque ésta resultó ser una característica debida al empaquetamiento del cristal, pues desaparece

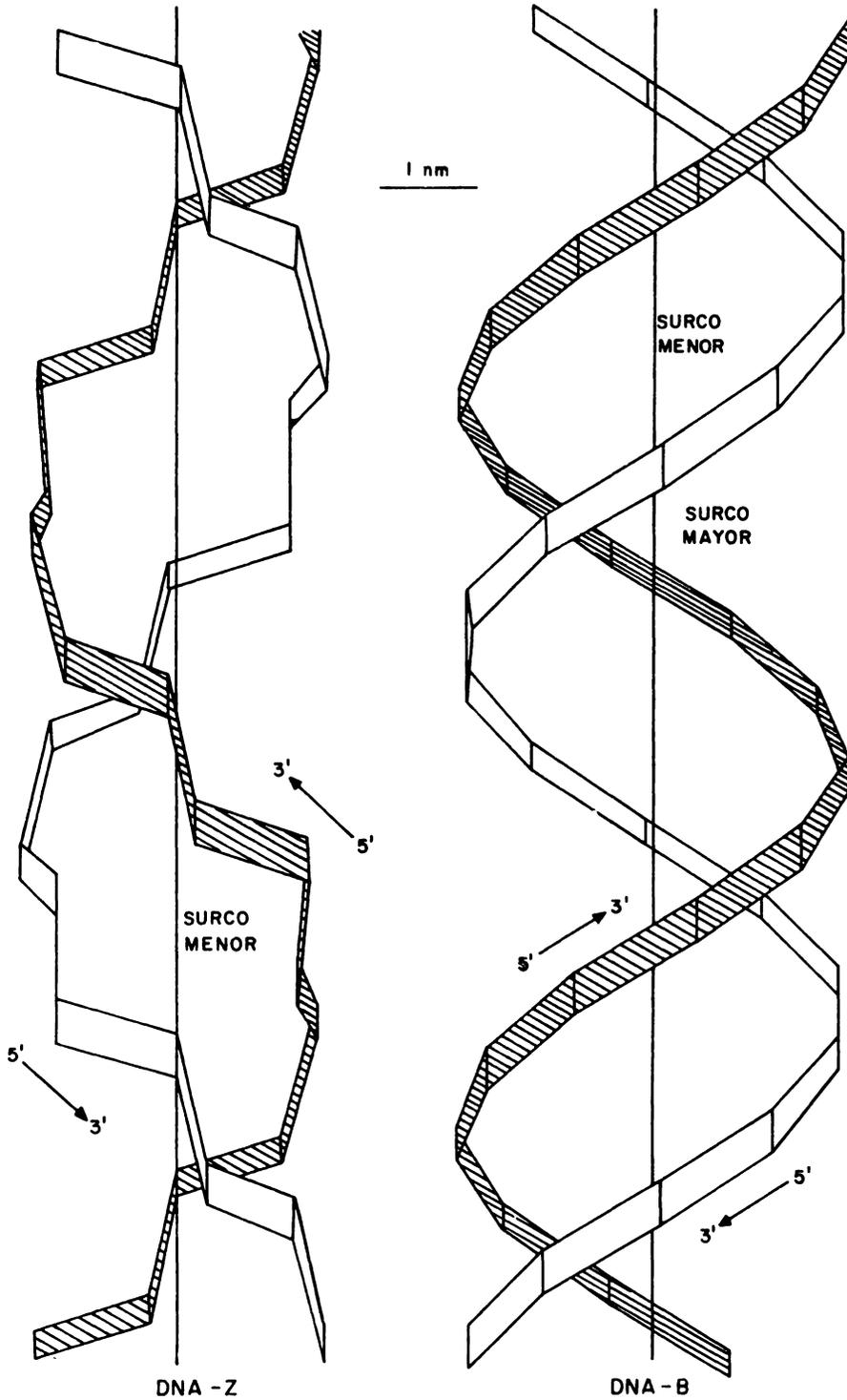


Fig. 5. Esquema de las cadenas de d-ribosa y fosfato en DNA-B y DNA-Z. Se pueden apreciar las características más notables de cada tipo de estructura secundaria. (Dibujado a partir de datos de Arnott y Hukins¹ y Wang y cols).⁵²

en solución,⁴¹ es un ejemplo interesante de la flexibilidad de la doble hélice. Otro descubrimiento fue que en el dodecanucleótido, los ángulos de torsión de la cadena presentan valores casi iguales a los propuestos en el modelo del DNA-B con excepción de dos, el ángulo delta (δ) que define la conformación del anillo de d-ribosa y el ángulo chi (χ) que define la conformación del d-nucleósido. Los valores de estos ángulos son muy variables y muestran una fuerte correlación lineal entre ellos.¹³ Además, los d-nucleótidos pirimídicos tienden a adquirir valores más pequeños para estos ángulos que los púricos,¹³ y en cada par de d-nucleótidos complementarios se presenta el principio de anticorrelación que consiste en que los valores de delta y chi de los d-nucleótidos están equidistantes de un punto central general.¹³

La secuencia de bases en el oligonucleótido también tiene influencia sobre la estructura de la doble hélice formada en el cristal y seguramente también en el DNA natural, pero en éste la variación de secuencias puede enmascarar el efecto.

Según la secuencia, el ángulo de giro de un par de bases respecto al anterior, es distinto; cuando una pirimidina sigue a una purina el giro es mayor que en el caso inverso.¹² Parece

como si algunos tramos de la hélice no fueran de DNA-B sino de algún otro de los modelos descritos para el DNA, pero los autores interpretan esto como variaciones locales de un DNA-B promedio.¹² La inclinación del plano de los pares de bases también se modifica con la secuencia. Cuando hay pirimidina y después purina la separación entre los planos es mayor del lado del surco menor, y cuando se presenta la secuencia contraria la separación de los planos es mayor del lado del surco mayor; si la secuencia es purina-purina o pirimidina-pirimidina, las distancias son casi iguales en ambos lados.^{12,13} (Tabla II.)

Todas estas características estructurales parecen ocasionadas por restricciones estéricas diferentes para cada tipo de d-nucleótido, y para explicarlas se ha propuesto un modelo de la dinámica de la estructura del DNA.¹³

Un último aspecto de interés a discutir es la hidratación del DNA en el cristal, ya que varía en diferentes sitios de la doble hélice y también es afectada por la secuencia. El surco mayor sólo está hidratado en los átomos de nitrógeno y oxígeno, mientras que el surco menor tiene una capa de hidratación doble y muy ordenada en las zonas que tienen *A* y *T*, que no existe donde hay *G* y *C*¹⁴ por efecto del grupo

TABLA II.
CARACTERISTICAS DE LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DEL DNA
ENCONTRADAS EN CRISTALES

Parámetro	MODELO		
	A ⁸	B ^{12,13,14,53}	Z ^{51,52}
Dirección de giro	Derecha	Derecha	Izquierda
Distancia entre pares de bases/nm	0.23	0.33 + 0.019	0.37
Número de bases por giro	10.7	10.1	12
Número de nucleótidos en la unidad respectiva	1	1	2
Diámetro de la hélice	—	2.0	1.8
Angulo de rotación por bases	33.6°	35.9° + 4.2°	—60°/2
Angulo de inclinación de las bases normal al eje de giro	+ 19	—1.2° + 4.1°	—7°
Distancia por giro completo/nm	2.46	3.32	4.46
Conformación del nucleósido	<i>Anti</i>	<i>Anti</i>	<i>Anti</i> en C <i>Syn</i> en G
Conformación de la d-ribosa	C3'-endo	C2'-endo A 01'-endo	C2'-endo en C C3'-endo en G

amino unido al carbono dos de la guanina. Por otro lado, los fosfatos no parecen tener hidratación ordenada.

A partir de estos datos se ha propuesto que el modelo del DNA-B en realidad es un promedio de los efectos de las distintas secuencias que pueden encontrarse en las fibras del DNA natural. Esto se podrá confirmar cuando se estudien más ejemplos de cristales del DNA; sin embargo, es interesante que los datos experimentales y el modelo teórico muestren tantas coincidencias. La misma variabilidad implica que para entender los efectos de la conformación en los fenómenos biológicos donde participa el DNA, será necesario un estudio más profundo de la relación entre la secuencia y la forma tridimensional en los sitios implicados en tales fenómenos.

OTROS MODELOS DE LA DOBLE HELICE

El DNA-B fue el primero, pero no el único modelo de doble hélice desarrollado antes de los estudios de cristales del DNA. Existen otros que tienen algunas diferencias, como el DNA-A¹ que también tiene importancia biológica porque se puede encontrar en muchas fibras del DNA natural, en híbridos de DNA y RNA y en zonas de RNA de doble hélice. El DNA-A está formado por dos cadenas antiparalelas y complementarias que giran a la derecha sobre un eje común, completan un giro cada once pares de bases y recorre una distancia de 2.86 nm. Además, las bases están más inclinadas respecto al plano normal al eje de giro y la complementariedad de bases es del mismo tipo que en el DNA-B. Los pares de bases giran 33° uno respecto al otro y la distancia entre ellas es de 0.26 nm. (Ver tabla I.) Este tipo de DNA es interconvertible con el DNA-B en casi todos los casos;²⁹ con una excepción importante para los polímeros formados por *A* y *T* alternadas, los cuales adquieren la forma de DNA-B pero difícilmente pasan a DNA-A.^{3,11,29} Esta característica podría deberse a las capas de hidratación del surco menor que se encuentran en las zonas con *A* y *T* del cristal de DNA-B que lo harían más estable respecto al DNA-A para este tipo de secuencia.^{8,14}

Para ambos tipos de DNA había incertidum-

bre en la forma real de la doble hélice, pero el análisis de la estructura de cristales⁸ ha revelado que esta forma de DNA es una doble hélice con giro a la derecha y, lo más sorprendente, con características prácticamente idénticas al modelo desarrollado mediante estudios en fibras. (Ver tabla II.) Esto no sería extraño a no ser por las variaciones observadas entre el cristal y el modelo clásico del DNA-B; el porqué de tales diferencias, es una nueva incógnita a resolver.

Hay otros modelos de la estructura secundaria del DNA que aunque han sido menos estudiados y son menos conocidos, vale la pena mencionarlos. (Ver tabla I.) El primero es el DNA-C^{2,32} que se forma en fibras con humedad relativa intermedia entre el DNA-A y el DNA-B. Aunque se ha descrito como un modelo particular,² algunos autores opinan que podría tratarse de un promedio de varias estructuras poco ordenadas que existen durante la transición entre las dos primeras conformaciones,³² como lo sugieren los rangos de variación de los valores de sus parámetros. En un giro de DNA-C puede haber entre 8 y 10 pares de bases, con lo cual el ángulo entre ellas varía desde 37° hasta 45°, y como la separación entre pares de bases es constante y alrededor de 0.33 nm, la distancia recorrida por cada giro completo es de 2.6 a 3.1 nm.

Otro modelo importante es el DNA-D, propuesto como la estructura que presentan las fibras con secuencia de purinas y pirimidinas alternadas en condiciones de humedad relativa intermedia y concentración baja de sal.^{3,11} Algunos DNA extracromosomales y el material genético de ciertos virus que tienen este tipo de composición, pueden presentar la forma de DNA-D. Sin embargo, los mejores ejemplos de esta conformación se han descrito en polímeros artificiales compuestos de *A* y *T*^{3,11,29,30} en los que el DNA-D completa un giro cada ocho pares de bases y recorre 2.4 nm, de modo que la distancia entre pares de bases es de 0.3 nm y el ángulo de giro de 45°. (Ver Fig. 5.)

LA NUEVA DOBLE HELICE

Hasta aquí las correcciones a los modelos clásicos de la estructura del DNA, salvo excep-

ciones, no son muy grandes y más bien eran esperadas. Sin embargo, en 1972 se publicaron observaciones de que las moléculas de DNA con secuencias alternadas de *G* y *C* pueden existir en dos conformaciones radicalmente distintas, pues al colocarlas en soluciones con concentraciones de sal altas⁴³ o de alcohol,⁴² presentan una inversión en el espectro de difracción circular y cambios paralelos en otras propiedades estudiadas.⁴³ Para explicar estos datos se propuso la posibilidad de que tales moléculas pudieran adquirir, además de las formas de DNA con giro a la derecha, una nueva conformación con giro a la izquierda.⁴³ En 1979 se descubrió una estructura de este tipo en cristales del hexanucleótido dCGCGCG⁵¹ y poco después en el tetranucleótido dCGCG^{9,15} y se le denominó DNA-Z. Es interesante mencionar que ésta fue la primera estructura determinada a partir de los estudios en cristales y resultó significativo que no se pareciera a ninguno de los modelos que hasta entonces se conocían. Casi de inmediato se asoció al DNA-Z con los cambios espectrales mencionados,⁵¹ y con estos criterios se pudo determinar que también se puede formar DNA-Z en fibras con *G* y *C* alternadas,²⁹ así como en cadenas de dAC-dTG²² y en moléculas de DNA con bases modificadas.^{4,27,33,34}

Además de la dirección de giro de la doble hélice, el DNA-Z tiene otras diferencias con respecto al DNA-B y las otras formas con giro a la derecha; algunas de las características de la doble hélice subsisten en ambos tipos de estructuras. El DNA-Z es una doble hélice de cadenas antiparalelas y complementarias con giro a la izquierda pero con apareamiento de bases iguales a los propuestos por Watson y Crick. En el DNA-Z se completa un giro con doce pares de bases, y mientras los nucleótidos pirimidínicos tienen conformación *anti* similar a la del DNA-B, los purínicos tienen conformación *syn* (ver Fig. 4), de modo que las cadenas continuas de d-ribosa y fosfato tienen forma de zig-zag, de ahí el nombre de DNA-Z.⁵¹ (Ver Fig. 5.) También, debido a la diferencia de conformación de los nucleótidos consecutivos, las secuencias *CG* y *GC* no son equivalentes por lo que la unidad repetitiva del DNA-Z está formada por dos pares de bases consecutivos en

lugar de uno, como en los modelos de DNA con giro a la derecha.⁵¹

Cuando la secuencia es *GC*, las bases giran casi 60° una respecto de la anterior y se apilan en forma similar al DNA-B, pero cuando la secuencia es *CG* casi no hay giro entre las bases. Más bien se presenta un desplazamiento de una sobre la otra y la citosina de una cadena se sobrepone a la citosina de la cadena complementaria, mientras que la guanina complementaria interactúa con la d-ribosa de su misma cadena.⁵¹

En el DNA-Z el eje de giro de las cadenas no pasa entre las bases complementarias como en el DNA-B, sino por fuera de éstas,⁵¹ por lo que al girar se forma un solo surco muy profundo que podría considerarse equivalente al surco menor del DNA-B,⁵¹ mientras que en lugar del surco mayor de éste el DNA-Z tiene una superficie convexa donde las bases quedan expuestas al medio, en especial el carbono ocho y el nitrógeno siete de la guanina y el carbono cinco de la citosina.⁵¹ (Ver tabla II.)

El fosfato de las cadenas del DNA-Z puede estar en dos posiciones diferentes que existen en distintos puntos de una cadena, modificando ligeramente la forma del DNA-Z. Cuando el fosfato está próximo al surco se denomina DNA-Z_I y cuando queda lejos DNA-Z_{II};⁵² como las dos conformaciones pueden existir en la misma cadena, los autores no las consideran como formas distintas de DNA-Z.⁵² Aun cuando en teoría se pueden construir cadenas de DNA-Z_I o DNA-Z_{II},⁵² tal vez se puedan considerar estas variantes como equivalentes a las que se presentan en los distintos tramos de la doble hélice en los cristales de DNA-B.

Para explicar la estabilización del DNA-Z, en un principio se propuso que la concentración alta de cationes permite la aproximación de los grupos fosfato necesaria para la aparición de la forma de DNA-Z.⁵¹ Así, la cristalización a partir de soluciones de concentración salina alta o baja, de formas esencialmente iguales del DNA-Z,^{9,51,52} se debería a la existencia de un equilibrio entre éste y el DNA-B en las cadenas con secuencias de *GC*, lo cual se inclina en favor del DNA-Z durante la cristalización o en concentraciones altas de sal.⁵² Sin embargo, el alcohol también permite la formación del DNA-Z,⁴² aun cuando disminuye la constante

dieléctrica del medio y aumenta la repulsión entre las cargas negativas de los fosfatos; por esto se piensa que también es importante la hidratación de las moléculas.⁹ Esta explicación es consistente con otras observaciones. Por un lado, las moléculas sintéticas con secuencia de AT que no pueden adquirir fácilmente la forma de DNA-A, tampoco adoptan la forma de DNA-Z,²⁹ quizá por el efecto estabilizador de la hidratación del surco menor del DNA-B.^{8,53} Por otro lado, en el surco del DNA-Z el grupo amino del carbono dos de la guanina se asocia, mediante puentes de hidrógeno, con una molécula de agua que a su vez está unida con un fosfato de la cadena y esto podría estabilizar el DNA-Z⁵¹ que junto con la hidratación del surco menor del DNA-B, ayudaría a explicar por qué los polímeros que no tienen G no adquieren la forma de DNA-Z y con dificultades la forma DNA-A, aunque tengan secuencias de purinas y pirimidinas alternadas.

Aun antes de que se describiera la estructura del DNA-Z, ya se había mencionado la posibilidad de que existiera doble hélice con giro a la izquierda del DNA-A, así como el B y el D, y aun se tenían modelos de éstos.³ Así, el DNA-Z resulta tan distinto a los modelos descritos que es imposible confundirlo con algún otro.⁵¹

DNA-Z NATURAL

Si la concentración de sal es apropiada se puede lograr que moléculas con secuencia adecuada pasen de DNA-B a DNA-Z, pero dichas concentraciones resultan tan altas,^{9,43} que muy bien se podría pensar en el DNA-Z como una curiosidad de laboratorio. Sin embargo, existen formas de disminuir de manera importante las concentraciones salinas necesarias para la transición y aun llevarlas a valores fisiológicos. Entre ellas están la presencia de poliaminas,⁹ la bromación de la citosina en la posición cinco y de la guanina en la posición ocho,²⁷ la metilación de la citosina también en posición cinco⁴ y de la guanina en la posición siete³⁴ y el superenrollamiento de la doble hélice.^{22,49} Varios de estos procesos se han asociado con el DNA natural. Se sabe que las poliaminas pueden estabilizar la estructura del DNA⁵⁸ y que la metilación de la citosina^{7,16} y el superenro-

llamiento^{18,23} participan en la regulación de la expresión de la información genética. Actualmente es importante definir si el DNA-Z existe o no en los seres vivos.

Aprovechando la capacidad inmunogénica del DNA-Z³⁵ se obtuvieron anticuerpos contra esta conformación del DNA^{27,31} y se usaron para desarrollar técnicas de inmunofluorescencia que permitieron detectar en el DNA de insectos,³⁸ roedores,³⁵ virus⁴⁰ y humanos,²⁶ zonas que presentan la forma de DNA-Z. Además, se pudo detectar en secuencias de DNA que presentan la forma llamada DNA-V⁴⁴ en la cual dos fibras sencillas de DNA circular cerradas se unen por complementaridad de bases, de manera que cualquier zona de doble hélice derecha que se forme debe ser compensada por una zona de doble hélice izquierda. Estos datos parecen indicar que el DNA-Z existe en el material genético de los seres vivos y es la doble hélice izquierda que se forma con mayor facilidad. Pero no todo está claro aún en este terreno, existe un punto de discrepancia en cuanto a la confianza que se puede tener en estos datos porque la unión de los anticuerpos depende de la técnica de fijación usada, según lo reportan algunos autores,²⁴ mientras otros señalan que es independiente.³⁵

En otros experimentos y mediante técnicas de hibridación, se han detectado en el genoma de levaduras,⁵⁰ humanos²¹ y otras especies,²² zonas de DNA con secuencias que podrían adoptar la forma de DNA-Z. Además, en el núcleo de células de *Drosophila* se han encontrado proteínas que se unen específicamente al DNA-Z y son capaces de estabilizarlo o facilitar el paso de DNA-B a DNA-Z y al parecer muestran cierta selectividad por las secuencias a las que se pueden unir.³⁹

Al parecer existe DNA-Z en los seres vivos y la pregunta es, ¿qué hacen ahí? La interrogante se planteó desde el momento en que se descubrió el DNA-Z, y la respuesta que más se ha manejado hasta ahora es que desempeña algún papel en la regulación de la expresión de la información genética. Aunque algunos datos parecen apoyar tal afirmación, aún no se puede llegar a ninguna conclusión definitiva. En los cromosomas de *Drosophila*³⁸ y en el tejido de rata,³⁵ los anticuerpos contra DNA-Z

tienen patrones de unión que no arrojan más datos que la presencia del mismo; en el virus SV40⁴⁰ el DNA-Z se encuentra formando parte de las regiones facilitadoras de la transcripción, y en otros virus hay zonas equivalentes con secuencias que potencialmente podrían adquirir esta conformación.⁴⁰ En la hemoglobina fetal humana²⁶ se forma DNA-Z en sitios del gene que corresponden a secuencias interpuestas que no se expresan (intrones) pero se sabe que pueden participar en la recombinación genética.²⁶ También en los intrones del gen de actina de corazón humano hay secciones con potencial para adquirir la forma de DNA-Z.²¹ En las levaduras las secuencias potenciales de DNA-Z se han encontrado en los extremos de los cromosomas que no se expresan pero que participan en la unión de segmentos del material (telómeros).⁵⁰

De lo antes expuesto queda claro que el DNA-Z existe o se puede formar en regiones de material genético que tienen importancia para el desempeño de la función biológica del DNA, pero también se puede ver que los datos que se tienen actualmente son insuficientes para elaborar un modelo de su papel. Existe una publicación que describe la posible interacción entre una proteína reguladora y una forma del DNA con giro a la izquierda,⁵⁷ aunque en este caso no se menciona el DNA-Z sino más bien una forma de DNA-B con giro a la izquierda. Sin embargo, ante la evidencia de que las dobles hélices que se forman con mayor facilidad son del tipo del DNA-Z, valdría la pena revisar la proposición original.

Por otro lado, la reparación del DNA no se efectúa cuando está en la forma de DNA-Z,²⁸ mientras que la endonucleasa sí actúa específicamente sobre DNA de cadena sencilla y es capaz de romper el DNA en las regiones de unión entre DNA-Z y DNA-B.⁴⁹

Las modificaciones químicas del DNA también facilitan la aparición de DNA-Z y esto puede ser de importancia biológica. Por ejemplo, está bastante bien establecido que la metilación de la citosina en posición cinco participa en la inhibición de la replicación del DNA y en general modifica su función. Aunque la expresión del DNA no requiere de una desmetilación total,⁶ no deja de ser atractiva la posi-

bilidad de asociar esta metilación con la estabilización de la forma de DNA-Z⁴ y, a través de ella, relacionar las modificaciones químicas del DNA con los cambios en la actividad biológica, ya que también se sabe que diferentes grados de metilación pueden modificar la estabilidad del DNA-Z.³⁴ Por otra parte, las modificaciones mediante otros agentes químicos exógenos son más difíciles de interpretar. Por ejemplo, algunos agentes cancerígenos que reaccionan con el DNA pueden favorecer la aparición de la forma DNA-Z,^{6,47} se supone que por inducción de cargas o efectos estéricos. En cambio, otros que producen uniones entre las cadenas del DNA dificultan el cambio de conformación.³⁷ Pero hay algunos que por su forma de unión deberían favorecer la formación del DNA-Z y no lo hacen.³⁷ Aunque se ha tratado de explicar esto mediante efectos estéricos o interacciones con diferentes posiciones de la doble hélice, la verdad es que aún no se entiende bien la naturaleza de las interacciones de dichas moléculas con el DNA.

En otro aspecto, resulta interesante que algunas zonas del DNA de células cancerosas presentan un grado de metilación menor en la citosina que las correspondientes células normales¹⁷ y aunque éste no es un fenómeno común a todos los sistemas estudiados, sería interesante averiguar si la diferencia en el grado de modificación química provoca alguna diferencia en la conformación de la doble hélice en los dos tipos de células.

CONCLUSION

El panorama en el estudio de la conformación de los ácidos nucleicos aún tiene muchos puntos que aclarar; la regularidad que parecía tener la doble hélice según su modelo original, no existe. En realidad el DNA parece ser una molécula muy flexible, mucho más de la que se suponía, y esta flexibilidad parece depender en buena medida de la secuencia, por lo cual la estructura secundaria de la doble hélice podría tener una influencia mayor de la que hoy se concede a la capacidad del DNA para cumplir sus funciones. Entonces, el estudio de los efectos que las variaciones en secuencia y las modificaciones químicas pueden tener sobre la conformación de la doble hélice adquiere un inte-

rés especial para tratar de comprender a nivel molecular los mecanismos de procesos como la diferenciación celular, la regulación de la replicación y transcripción del DNA y la acción que diferentes agentes puedan tener sobre estas funciones. Sin lugar a dudas los resultados de estos estudios tendrán implicaciones enormes en todos los campos de las ciencias biológicas.

RESUMEN

Los estudios de difracción de rayos X en cristales de oligonucleótidos del DNA que forman fragmentos de doble hélice, han incrementado en forma notable el conocimiento de la estructura secundaria de dicha molécula.

Los resultados obtenidos hasta hoy, muestran al DNA como una molécula flexible cuya conformación depende, por lo menos parcialmente, de la secuencia de bases que la forman. El efecto de la secuencia se había propuesto con anterioridad pero las estructuras encontradas en cristales, además de ejemplificarlo en forma clara, han aportado evidencia espectacular, como el descubrimiento de la llamada forma "Z" del DNA, que es una doble hélice con giro a la izquierda, encontrada en oligonucleótidos con secuencia de guanina y citosina alternadas pero que en realidad se puede formar en cualquier secuencia con purinas y pirimidinas alternadas o alguna muy parecida. Varios experimentos realizados indican que el DNA-Z se puede formar en el DNA de seres vivos y podría tener alguna función biológica.

SUMMARY

The single crystal X-ray analysis of DNA are increasing our understanding of the details of DNA secondary structure.

The data so far available, shows us the double helix of DNA as a flexible molecule with a conformation that depends on base sequence, this effect was already known before the study of crystals began and the structures found, give us many examples to illustrate it, but also some surprising results emerged like the "Z" form of DNA, a left-handed double helix, discovered

first in crystals of oligonucleotides with and alternating sequence of cytosine and guanine, but that can be formed in sequences with purine-pyrimidine alternation or some related to them. Z-DNA can be formed in the DNA of living cells and might be of importance in biology.

BIBLIOGRAFIA

1. Arnott, S. y Hukins, D.W.L. (1972). "Optimised parameters for A-DNA and B-DNA". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 1504-1509.
2. Arnott, S. y Selsing, E. (1975). "The Conformation of C-DNA". *J. Mol. Biol.* **98**, 265-269.
3. Arnott, S.; Chandrasekaran, R.; Hukins, D.W. L.; Smith, P.J. C. y Watts, L. (1974). "Structural Details of a Double-helix Observed for DNAs containing Alternating Purine and Pyrimidine Sequences". *J. Mol. Biol.* **88**, 523-533.
4. Behe, M. y Felsenfeld, G. (1981). "Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: The B-Z transition in poly (dG-m⁵dG) poly (dG-m⁵dC)". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1619-1623.
5. Berg, P. (1981). "Dissections and Reconstructions of Genes and Chromosomes". *Science*, **213**, 296-303.
6. Bird, A.P. (1984). "DNA methylation-how important in gene control". *Nature*, **307**, 503-504.
7. Brown, D.D. (1981). "Gene Expression in Eukaryotes". *Science*, **211**, 667-674.
8. Conner, B. N.; Takamo, T.; Tanaka, S., Itakura, K. y Dickerson, R. E. (1982). "The molecular structure of d(CpCpGpG), a fragment of right-handed double helical A-DNA". *Nature*, **259**, 294-299.
9. Crawford, J.L.; Kolpak, F.J.; Wang, A. H. J.; Quigley, G.J.; van Boom, J. H.; van der Marel, G. y Rich, A. (1980). "The tetramer d(CpGpCpG) crystallizes as a left-handed double helix". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4016-4020.
10. Crick, F.H.C.; Wang, J.C. y Bauer, W.R. (1979). "Is DNA Really a Double Helix?". *J. Mol. Biol.*, **129**, 149-461.
11. Davies, D.R. y Baldwin, R.L. (1963). "X-ray Studies of Two Synthetic DNA Copolymers". *J. Mol. Biol.*, **6**, 251-255.
12. Dickerson, R.E. y Drew, H.R. (1981). "Structure of a B-DNA Dodecamer. II. Influence of Base Sequences on Helix Structure". *J. Mol. Biol.*, **149**, 761, 786.
13. ——— (1981). "Kinematic model for B-DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7318-7322.
14. Drew, H.R. y Dickerson, R.E. (1981). "Structure of a B-DNA Dodecamer. III. Geometry of hydration". *J. Mol. Biol.*, **151**, 535-556.
15. Drew, H.; Takano, T.; Tanaka, S.; Itakura, K. y Dickerson, R.E. (1980). "High-salt d(CpGpCpG), a left-handed Z-DNA double helix". *Nature*, **286**, 567-573.

16. Ehrlich, M. y Wang, R.Y.-H. (1981). "5-Methylcytosine in Eukaryotic DNA". *Science*, **212**, 1350-1357.
17. Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983). "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts". *Nature*, **301**, 89-92.
18. Fisher, M. (1984). "DNA supercoiling and gene expression". *Nature*, **307**, 686-687.
19. Felsenfeld, G. y McGhee, J. (1982). "Methylation and gene control". *Nature*, **296**, 602-603.
20. Gupta, G.; Bansal, M. y Sasisekharan, V. (1980). "Conformational flexibility of DNA: Polymorphism and handedness". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6486-6490.
21. Hamada, H. y Kakunaga, T. (1982). "Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome". *Nature*, **298**, 396-398.
22. Haniford, D.B. y Pulleyblank, D.E. (1983). "Facile transition of poly d(TG) d(CA) into a left-handed helix in physiological conditions". *Nature*, **302**, 632-634.
23. Harland, R.M.; Weintraub, H. y McKnight, S.L. (1983). "Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology". *Nature*, **302**, 38-43.
24. Hill, R.J. y Stollar, B.D. (1983). "Dependence of Z-DNA antibody binding to polytene chromosomes on acid fixation and DNA torsional strain". *Nature*, **305**, 338-340.
25. Hopkins, R.C. (1981). "Deoxyribonucleic Acid Structure: A New Model". *Science*, **211**, 289-291.
26. Kilpatrick, M.W.; Klysik, J.; Singleton, C.K.; Zarlring, D.A.; Jovin, T.M.; Hanau, L.H.; Erlanger, B.F. Y Wells, R.D. (1984). "Intervening Sequences in Human Fetal Globin Genes Adopt Left-handed Z helices". *J. Biol. Chem.*, **259**, 7268-7274.
27. Lafer, E.M.; Moller, A.; Nordheim, A., Stollar, B.D. y Rich, A. (1981). "Antibodies specific for left-handed Z-DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3546-3550.
28. Lagravere, C.; Malfoy, B.; Leng, M. y Laval, J. (1984). "Ring-opened alkylated guanine is not repaired in Z-DNA". *Nature*, **310**, 798-800.
29. Leslie, A.G.W.; Arnott, S.; Chandrasekaran, R. y Ratliff, R.L. (1980). "Polymorphism of DNA Double Helices". *J. Mol. Biol.*, **143**, 49-72.
30. Mahendrasingam, A.; Rhodes, N.J.; Goodwin, D.C.; Nave, C.; Pigram, W.J.; Fuller, W.; Brahm, J. y Vergne, J. (1983). "Conformational transitions in oriented fibres of the synthetic polynucleotide poly d(AT) poly d(AT) double helix". *Nature*, **301**, 535-537.
31. Malfoy, B. y Leng, M. (1981). "Antiserum to Z-DNA". *FEBS Letters*, **132**, 45-48.
32. Marvin, D.A.; Spencer, M.; Wilkins, M.H.F. y Hamilton, L.D. (1961). "The Molecular Configurations of Deoxyribonucleic Acid III. X-ray Diffraction Study of the C form of the Lithium Salt". *J. Mol. Biol.*, **3**, 547-565.
33. McIntosh, L.P.; Grieger, I.; Eckstein, F.; Zarlring, D.A.; van de Sande, J.H. y Jovin, T.M. (1983). "Left-handed helical conformation of poly d(A-m⁵C). d(G-T)". *Nature*, **304**, 83-86.
34. Moller, A.; Nordheim, A.; Nichols, S.R. y Rich, A. (1981). "7-Methylguanine in poly (dG-dG) poly (dG-dC) facilitates Z-DNA formation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4777-4781.
35. Morgenegg, G.; Celio, M.R.; Malfoy, B.; Leng, M. y Kuenzle, C.C. (1983). "Z-DNA immunoreactivity in rat tissues". *Nature*, **303**, 540-543.
36. Motulsky, A.G. (1983). "Impact of Genetic Manipulation on Society and Medicine". *Science*, **219**, 135-140.
37. Nordheim, A.; Hao, W.M.; Wogan, G.N. y Rich, A. (1983). "Salt Induced Conversion of B-DNA to Z-DNA inhibited by Aflatoxin B1". *Science*, **219**, 1434-1436.
38. Nordheim, A., Pardue, M.L.; Lafer, E.M.; Moller, A.; Stollar, B.D. y Rich, A. (1981). "Antibodies to left-handed Z-DNA bind to interband regions of *Drosophila* polytene chromosomes". *Nature*, **294**, 417-422.
39. Nordheim, A.; Tesser, P.; Azorin, F.; Kwon, Y.A.; Moller, A. y Rich, A. (1982). "Isolation of *Drosophila* proteins that bind selectively to left-handed Z-DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7729-7733.
40. Nordheim, A. y Rich, A. (1983). "Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences". *Nature*, **303**, 674-679.
41. Patel, D.J.; Pardi, A. y Itakura, K. (1982). "DNA Conformation, Dynamics, and Interactions in Solution". *Science*, **216**, 581-590.
42. Pohl, F.M. (1976). "Polymorphism of a synthetic DNA in solution". *Nature*, **260**, 365-366.
43. Pohl, F.M. y Jovin, T.M. (1972). "Salt-induced Cooperative Conformational Changes of a Synthetic DNA: Equilibrium and Kinetic Studies with Poly (dG-dC)". *J. Mol. Biol.*, **67**, 375-396.
44. Pohl, F.M.; Thomae, R. y Dicapua, E. (1982). "Antibodies to Z-DNA interact with form V-DNA". *Nature*, **300**, 545-546.
45. Rodley, G.A.; Scobie, R.S.; Bates, R.H.T. y Lewitt, R.M. (1976). "A possible conformation for double-stranded polynucleotides". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2959-2963.
46. Sage, E. y Leng, M. (1980). "Conformation of poly (dG-dC) poly (dG-dC) modified by the carcinogens N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorene and N-hydroxy-N-2-aminofluorene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4597-46-1.
47. Santella, R.M.; Grunberger, D.; Weinstein, I.B. y Rich, A. (1981). "Induction of the Z conformation in poly (dG-dC). poly (dG-dC) by binding of N-2-acetylaminofluorene to guanine residues". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1451-1455.
48. Sasisekharan, V.; Pattabiraman, N. y Gupta, G. (1978). "Some implications of an alternative structure for DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4092-4096.
49. Singleton, C.K.; Klysik, J.; Stirdivant, S.M. y Wells, R.D. (1982). "Left-handed Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions". *Nature*, **299**, 312-316.

50. Walsley, R.M.; Szostak, J.W. y Petes, T.M. (1983). "Is there left handed DNA at the ends of yeast chromosomes?". *Nature*, **302**, 84-86.
51. Wang, A.H.J.; Quigley, G.J.; Kolpak, F.J.; Carwford, J.L.; van Boom, J.H.; van der Marel, G. y Rich, A. (1979). "Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution". *Nature*, **282**, 680-686.
52. Wang, A.H.J.; Quigley, G.J.; Kolpak, F.J.; van der Marel, G.; van Boom, J.H. y Rich, A. (1981). "Left-Handed Double Helical DNA: Variations in Backbone Conformation". *Science*, **211**, 171-176.
53. Wing, R.; Drew, H.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K. y Dickerson, R.E. (1980). "Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature*, **287**, 755-758.
54. Watson, J.D. y Crick, F.H.C. (1953). "Molecular Structure of Nucleic Acids. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid". *Nature*, **171**, 737-738.
55. ——— (1953). "Genetic Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid". *Nature*, **171**, 964-967.
56. Metzler, D.E.: *Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells*. New York, San Francisco, London, Academic Press, 1977.
57. McKay, D.B. y Steitz, T.A. (1981). "Structure of Catabolic Activator Gene at 2.9 A Resolution Suggest Binding to Left-Handed B-DNA". *Nature*, **290**, 744-749.
58. Tabor, H. y Tabor, C.W. (1964). "Spermidine, Spermine, and related Amines". *Pharmacol. Rev.*, **16**, 245-287.